ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1974

N° 88

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DIAGNOSTIC DE LA RAGE: RECHERCHE DU VIRUS RABIQUE SUR LA CORNEE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
Diplôme d'Etat

présentée et soutenue publiquement en 1974
devant l'Université Paul-Sabatier

PAR

RUDANT Jean-François
né le 5 Juillet 1951, à Paris

Jury de Thèse :

Président : M. ARMENGAUD
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Membres : MM. SAURAT ET ESPINASSE
Professeurs à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

ÉDITEUR SODIPE
PARIS 1974

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DIAGNOSTIC DE LA RAGE: RECHERCHE DU VIRUS RABIQUE SUR LA CORNEE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549602_0012

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1974

N° 88

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DIAGNOSTIC DE LA RAGE: RECHERCHE DU VIRUS RABIQUE SUR LA CORNEE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
Diplôme d'Etat

présentée et soutenue publiquement en 1974
devant l'Université Paul-Sabatier

PAR

RUDANT Jean-François
né le 5 Juillet 1951, à Paris

Jury de Thèse :

Président : M. ARMENGAUD
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Membres : MM. SAURAT ET ESPINASSE
Professeurs à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

ÉDITEUR SODIPE
PARIS 1974

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

DIRECTEUR . . . . . MM. LAUTIE
DIRECTEURS HONORAIRES . PONS, DARRASPEN
FLORIO
PROFESSEUR HONORAIRE. . LOMBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie et Toxicologie
Professeur titulaire . . . . **M. Godfrain**
Maître-Assistant agrégé. . **Mme Burgat-Sacaze**
Pharmacie et Toxicologie

Chaire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales
Professeur titulaire . . . . **M. Rico**
Maître-Assistant. . . . . **M. Braun**
Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologie et Médicale

Chaire d'Anatomie des Animaux domestiques
Professeur titulaire . . . . **M. Pavaux**
Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

Chaire de Physiologie et Thérapeutique
Professeur titulaire . . . . **M. Ruckebusch**
Maître de Conférences
non Chef de Service . . . **M. Fargeas**
Maître-Assistant. . . . . **M. Toutain**
Physiologie - Thérapeutique et
Pharmacodynamie

Chaire d'Histologie - Anatomie Pathologique
Professeur titulaire . . . . **M. Van Haverbeke**
Professeur sans Chaire. . **M. Cabanié**
Maître-Assistant. . . . . **M. Magnol**
Histologie - Embryologie - Anatomie
Pathologique

Chaire d'Hygiène et Industrie des aliments d'origine animale
Professeur titulaire . . . . **M. Labie**
Maître-Assistant. . . . . **M. Eeckhoutte**
Maître-Assistant. . . . . **Mme Benard**
Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie
des Denrées Alimentaires d'origine animale

Chaire de Parasitologie et Maladies Parásitaires
Professeur titulaire . . . . **M. Brizard**
Maître de Conférences
non Chef de Service . . . **M. Dorchies**
Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne-Clinique

Chaire de Séméiologie et Phatologie Médicale des Équidés et Carnivores
Professeur titulaire . . . . **M. Florio**
Professeur sans Chaire . . **M. Lescure**
Maître-Assistant. . . . . **M. Guelfi**
Séméiologie et Pathologie Médicale
des Équides et Carnivores
Législation Vétérinaire et
Déontologie Clinique

Chaire de Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de basse-cour
Professeur titulaire . . . . **M. Tournut**
Professeur sans Chaire . . **M. Espinasse**
Maître-Assistant. . . . . **M. Bezille**
Séméiologie et Pathologie Médicale
du Bétail et Animaux de Basse-cour
Clinique
Clinique Ambulatoire

Chaire de Pathologie Chirurgicale
Professeur titulaire . . . . **M. Cazieux**
Maître-Assistant. . . . . **M. Dickelé**
Maître-Assistant. . . . . **M. Genevois**
Propédeutique et Séméiologie Chirurgicale
Technique Chirurgicale Pathologie
Chirurgicale

Chaire de Pathologie de la Reproduction
Professeur titulaire . . . . **M. Berthelon**
Professeur sans Chaire. . **M. Royal**
Maître-Assistant. . . . . **M. Tainturier**
Séméiologie et Propédeutique
Pathologie de la Reproduction Obstétrique
Clinique

Chaire de Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation sanitaire
Professeur titulaire . . . . **M. Saurat**
Maître de Conférences
non Chef de Service. . . **M. Chantal**
Maître-Assistant. . . . . **M. Ganière**
Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation sanitaire

UNIV. LEIDEN BIBL.

Chaire de Pathologie Générale - Microbiologie - Immunologie

Professeur titulaire . . . . **M. Lautie**
Maître-Assistant. . . . . **M. Meignier**
Microbiologie - Immunologie Pathologie Générale

Chaire de Zootechnie et Économie rurale

Professeur titulaire . . . . **M. Queinnec**
Maître-Assistant. . . . . **M. Darre**
Ethnologie - Génétique appliquée
Hygiène Générale - Zootechnie
Élevage
Économie Générale et des Productions Animales

Chaire d'Alimentation

Professeur titulaire . . . . **M. Faliu**
Maître de Conférences non Chef de Service. . . **M. Griess**
Maître-Assistant . . . . . **M. Paragon**
Botanique appliquée et Bromatologie
Agronomie - Alimentation

COURS COMPLÉMENTAIRES — CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies infectieuses . . . . . **M. Monnier**
Aspect Médical des Zoonoses . . . . . **M. Armengaud**
Énergétique . . . . . **M. Labouche**
Initiation à l'Informatique Biomédicale . . . . . **M. Fernet**
Agronomie. . . . . **M. Combret**
Métabolisme. . . . . **M. Raynaud**

La Faculté et l'École déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats. (Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'École en date du 13 juin 1924).

A MES PARENTS

A MARC et DENIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR ARMENGAUD

de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre Jury de Thèse.

A NOTRE JURY DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR SAURAT

de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Chevalier de la Légion d'Honneur

Que nous remercions de bien avoir voulu guider notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR ESPINASSE

de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre Jury de Thèse.

Sincère reconnaissance.

A MADEMOISELLE EYCHENNE

Pour l'aide précieuse qu'elle nous a toujours aimablement fournie.

PLAN GÉNÉRAL

INTRODUCTION

I.1 - ÉPIDÉMIOLOGIE

I.2 - MÉTHODES ACTUELLES DE DIAGNOSTIC COURANT

Histologie

Inoculation à l'animal

Immunofluorescence cérébrale

I.3 - PATHOGÉNIE

I.4 - ANATOMIE NERVEUSE DE L'OEIL ET DES GLANDES SALIVAIRES

TRAVAUX DE SCHNEIDER

TRAVAUX DE ZIMMERMANN

TRAVAUX DE MÉDECINE HUMAINE ET DIAGNOSTIC CHEZ L'HOMME

OBSERVATIONS PERSONNELLES

I.– PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

I. - Mode d'inoculation

I.1 - Souche

I.2 - Voie d'inoculation

I.2.1 – Souris

I.2.2 – Lapin

I.2.2.1 – Inoculation intracranienne

I.2.2.2 – Inoculation intra-musculaire

II. - Observation des symptômes

II.1 - Souris

II.2 - Lapin

III. - Réalisation du frottis

IV. - Réalisation de l'IF substance cérébrale

IV.1 - Préparation des décalques

IV.1.1– Souris

IV.1.2– Lapin

II.– OBSERVATIONS

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

I.1 – ÉPIDÉMIOLOGIE

Lors de notre scolarité à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, nous avons été tout de suite intéressé par l'étude de la rage. Le début de l'épidémie actuelle ayant pris place quelques mois avant notre arrivée dans cet établissement.

C'est devant l'intérêt grandissant de cette maladie que nous avons pris la décision de nous pencher tout particulièrement sur une nouvelle méthode de diagnostic, qui semble très prometteuse : *le frottis cornéen,* méthode employant le procédé d'immunofluorescence pour révéler la présence d'éventuels antigènes rabiques dans les cellules de la cornée.

Après une rapide mise au point épidémiologique et un rappel des actuelles méthodes de diagnostic, nous étudierons en détail le frottis cornéen et ses applications pratiques, puis nous ferons part de nos observations personnelles sur le sujet.

♦ ♦
♦

Pour débuter cette étude, il n'est pas inutile de rappeler l'importance qu'a acquise la rage au cours des dernières années, tout particulièrement en France.

En effet, quand une maladie aussi grave se propage à une telle rapidité et sans qu'on puisse l'arrêter, le chercheur doit se proposer de trouver des méthodes de diagnostic plus rapides à mettre en œuvre que celles connues jusque là, quelle que soit la valeur de ces dernières.

En France, au siècle dernier, la rage était essentiellement une maladie citadine très dangereuse pour l'homme, puisque transmise par le chien.

La France était considérée comme assainie depuis 1926 et seuls quelques foyers erratiques éclataient pour rappeler l'existence du fléau rabique.

Et puis, en 1968, à nouveau la maladie pénétrait dans l'Est de la France.

On signalait :
- 64 cas diagnostiqués en 1968
- 344 cas diagnostiqués en 1969
- 513 cas diagnostiqués en 1970
- 905 cas diagnostiqués en 1971
- 1027 cas diagnostiqués en 1972
- 1051 cas diagnostiqués en 1973.

Et selon les travaux de *ANDRAL et TOMA* on peut estimer qu'un nombre de cas cinq à dix fois supérieurs, sont restés inaperçus ou non signalés pour la rage des animaux sauvages et tout particulièrement pour la rage du renard.

Malgré ces omissions forcées, le renard vient largement en tête des cas diagnostiqués.

Les bovins arrivent en seconde position, ce qui est loin d'être négligeable économiquement. Toutefois, la vaccination anti-rabique mise en œuvre dans les régions infestées, amenait dès 1972, un nombre de cas diagnostiqués très inférieur à celui de 1971 et même à celui de 1970.

La maladie progresse actuellement régulièrement de 30 à 60 kms par an. La progression en 1973 a été nette vers le sud, en particulier dans le département de la Haute Saône.

La rage suit actuellement un front limité par les villes suivantes :

Hirson dans l'Aisne, Reims, Chalons-sur-Marne,

Vitry le François, Chaumont, Vesoul, Luxeuil, Colmar, Strasbourg.

I.2 – MÉTHODES ACTUELLES DE DIAGNOSTIC COURANT

Pour diagnostiquer les cas de rage ainsi recensés, les laboratoires spécialisés emploient couramment trois méthodes de recherche.

Ce sont :

- Le diagnostic par histologie.
- L'inoculation à l'animal témoin.
- La méthode d'immunofluorescence généralement indirecte.

Le point commun de ces trois méthodes est qu'elles ne peuvent être pratiquées qu'après la mort naturelle ou provoquée de l'animal suspect.

1) HISTOLOGIE

La méthode histologique consiste en la recherche des corps de Négri mis en évidence par la coloration de Sellers. Cette coloration est en général appliquée à des coupes histologiques de cerveau intéressant la région de la corne d'Ammon et l'hippocampe. Ces parties sont, en effet, toujours riches en antigènes rabiques.

2) INOCULATION A L'ANIMAL

L'inoculation à l'animal témoin consiste à infecter l'animal choisi *(en général une souris ou mieux un lot de souris)* par voie intra-cérébrale, à l'aide d'une suspension cérébrale réalisée à partir de l'encéphale de l'animal suspect.

Cette méthode est excellente mais longue, puisqu'il faut souvent attendre plusieurs semaines la mort de l'animal témoin.

3) IMMUNOFLUORESCENCE CÉRÉBRALE

La troisième méthode consiste en la mise en évidence des antigènes rabiques par un conjugué fluorescent qui se fixe spécialement sur eux. La coloration est, là aussi, effectuée sur la corne d'Ammon et l'hippocampe. C'est actuellement la méthode la plus pratique et la plus rapide de recherche du virion rabique.

Mais jusqu'à ce jour, il n'existait pas de moyens permettant le diagnostic de la rage sur l'animal vivant malade et à fortiori, sur l'animal vivant encore apparemment sain.

Par exemple lorsqu'un chien avait mordu un homme, il était impossible d'avoir une idée immédiate de l'état infectieux rabique ou non de l'animal mordeur.

Avec le test de la cornée sur lequel nous allons maintenant nous pencher, cela devient possible puisque ce test se pratique sur l'animal vivant, sans aucune difficulté.

Avant d'envisager l'étude pratique de cette méthode, il est tout d'abord nécessaire de faire des rappels de pathogénie de la rage et d'anatomie nerveuse crânienne, pour bien comprendre la démarche qui a conduit à la réalisation de ce test.

I.3 – PATHOGÉNIE DE LA RAGE

Le virus pénètre dans l'organisme le plus souvent par une effraction cutanée provoquée, en général, par la morsure.

Galtier a montré dès 1884, que le virus diffuse ensuite très rapidement dans l'organisme. Il utiliserait pour ce faire,

les gaines lymphatiques périneurales.

Il s'y multiplierait et de proche en proche, toujours de manière centripète, il gagnerait les centres nerveux supérieurs où il prolifère.

Il se disperse alors dans tout l'organisme, toujours au moyen des gaines périneurales, mais en sens inverse.

C'est ce que l'on nomme le phénomène de septinévrite.

On peut considérer que le virus commence à diffuser à partir de la morsure en 3 à 6 heures et qu'il atteint le cerveau en 8 à 10 jours. Mais cette durée dépend grandement du siège de la morsure. L'incubation sera toujours plus longue dans le cas d'une morsure des extrémités, que dans celui d'une blessure à la face.

Certains nerfs utilisés par le virus comme voie de cheminement pendant la septinévrite, vont nous intéresser tout particulièrement. Ce sont les nerfs craniens et principalement ceux qui innervent l'œil et les glandes salivaires.

I.4 – ANATOMIE NERVEUSE DE L'OEIL ET DES GLANDES SALIVAIRES

Ces nerfs sont courts et seront donc parcourus rapidement par le virus qui arrivera tôt dans ces organes.

INNERVATION DE L'OEIL

Le gros nerf optique est responsable de la vision. Il provient de la rétine, est sensitif et transmet les impressions visuelles. Nous verrons que par le biais de ce tronc nerveux, la rétine est toujours très riche en antigènes rabiques.

En ce qui concerne l'innervation du reste de l'œil, on note la participation de deux nerfs principaux.

Pour la motricité de l'iris et celle des muscles ciliaires accomodateurs, c'est le contingent de fibres sympathiques du nerf oculomoteur commun n° 3 qui agit.

La cornée elle, de même que l'œil en général, est innervée par la branche ophtalmique du nerf trijumeau ou nerf de Willis et plus exactement par l'une des trois divisions de cette branche, le nerf nasociliaire.

Les glandes salivaires reçoivent de nombreux contingents de fibres craniennes. Nous retiendrons :

- La portion végétative du nerf trijumeau qui innerve toutes les glandes salivaires.
- La corde du tympan et le nerf lingual qui innervent les glandes maxillaires et sublinguales.
- Le nerf facial innerve également la parotide, quoique la secrétion de cette glande dépende du nerf trijumeau exclusivement.

Ainsi donc nous notons que l'œil et les glandes salivaires sont innervés par des nerfs courts et de longueurs à peu près identiques chez certaines espèces animales. Donc, lors du phénomène de septinévrite, ces organes seront atteints précocement et à peu près simultanément par les virions rabiques.

La cornée peut donc être considérée comme un élément valable de diagnostic, étant donné sa richesse en terminaisons nerveuses. Certains n'hésitent pas à en faire, pour les raisons évoquées plus haut, un témoin de l'infection ou de la non infection des glandes salivaires.

Le prélèvement de cellules cornéennes est de plus, comme nous le verrons, aisé à réaliser sans danger ni pour l'œil ni pour la vie de l'animal considéré.

Il est curieux, comme le note Schneider, et au vu des renseignements ci-dessus, que si peu d'attention ait jusqu'ici

été apportée à la cornée dans l'étude de la rage.

Levaditi et Schoen trouvèrent, en 1935, de petits corps de Négri dans les cellules épithéliales cornéennes de lapins et chez une souris ; leurs recherches restèrent vaines en ce qui concerne les cobayes, des chats, un chien et plusieurs singes.

Ces corps de Négri étaient toutefois petits et peu nombreux, ce qui explique peut-être que cette méthode de diagnostic soit tombée rapidement dans l'oubli.

Les méthodes modernes d'immunofluorescence qui permettent de mettre en évidence de très fines particules antigéniques, en tout cas bien plus petites que les corps de Négri, ont amené Schneider, puis Zimmermann et bien d'autres chercheurs, à s'intéresser à nouveau à la cornée et à ses ressources en ce qui concerne le diagnostic.

C'est à Schneider que revient le mérite de la mise au point du frottis cornéen.

Nous étudierons ses travaux sur la souris infectée artificiellement puis ceux de Zimmermann qui œuvra sur des animaux infectés naturellement.

Enfin, après quelques applications récentes de cette méthode au diagnostic de la rage chez l'homme, nous parlerons de nos observations personnelles réalisées au laboratoire de maladies contagieuses de l'Ecole de Toulouse, sur le lapin et la souris infectés artificiellement.

TRAVAUX DE SCHNEIDER

Schneider utilise pour expérimenter, des souris N.M.R.I. agées de 3 semaines.

Deux voies d'inoculation sont utilisées suivant les lots :

- soit la voie intra-cérébrale,
- soit la voie sous-cutanée plantaire.

Deux sortes d'inoculum sont également employées, à savoir :

- un virus fraichement isolé, d'origine humaine *(nommé S.V.M.3)* et qui est préparé de deux manières :
  - soit une préparation A dite *«non diluée»* qui est, en fait, une suspension à 10% de cerveaux de souris infectées, dans une solution contenant 2% de sérum de cheval et comme diluant, de l'eau distillée.
  - soit une préparation B représentant des dilutions variées de la préparation A, toujours dans de l'eau distillée.

La dose injectée est toujours de 0,03 ml quelles que soient la voie et la dilution.

RÉALISATION DU FROTTIS

La lame microscopique est appuyée plusieurs fois fortement sur le globe oculaire saillant de la souris. On réalise un frottis à chacune de ses extrémités. Schneider insiste sur le fait que l'œil de la souris n'en souffre absolument pas, arguant du fait que l'expérimentateur ne fait là qu'accélérer légèrement un processus de desquamation naturelle des cellules de la cornée.

Il n'y a donc aucun inconvénient à répéter l'opération plusieurs jours de suite.

Le but de ce travail est de recueillir sur la lame le plus grand nombre possible de cellules épithéliales cornéennes.

Ensuite la lame est traitée conformément à la technique classique d'immunofluorescence brièvement rappelée ici :

- Séchage à l'air de la lame puis fixation à l'acétone pendant 2 à 24 heures, à une température comprise entre - 15° et - 20° C.
- Egouttage et séchage au congélateur, puis coloration proprement dite avec les suspensions colorantes préparées, l'une avec un cerveau de souris saine, l'autre avec un cerveau de souris infectée.
- Ensuite immerger les lames dans l'eau à 37° puis placer à l'étuve pendant 1 h.
- La lame est alors lavée au soluté isotonique de chlorure de sodium tamponné à ph 7,2 - puis placée 10 minutes dans un récipient contenant ce même sérum. Séchage en position debout.
- Eventuellement placer ensuite une goutte de glycérol à 50% tamponné à ph 7,6 et poser une lamelle sur la lame.

Le conjugué fluorescent employé par Schneider est un sérum de cheval pourvu d'anticorps rabiques et partiellement purifié.

Lors de l'étude microscopique *(grossissement 400)* des lames ainsi préparées, Schneider put noter la présence de particules antigéniques virales à fluorescence particulièrement vive.

L'aspect de ces antigènes était le même que celui des préparations de substances cérébrales, à savoir :

- Soit de fines ponctuations fluorescentes ressemblant à de la poussière et distribuées dans tout le cytoplasme.

- Soit des particules arrangées en couronnes autour du noyau.

La proportion de cellules trouvées porteuses de ces antigènes est très variable. Elle varie de 0,1 à 15% et change pour un même animal selon que l'on travaille sur l'œil droit ou sur l'œil gauche.

Selon Schneider cette proportion ne change pas pour un œil donné du début à la fin de la période d'observation.

Un frottis cornéen est déclaré positif lorsque l'on y trouve au moins une cellule présentant un des deux aspects caractéristiques déjà décrits. L'auteur note que cet aspect ne peut prêter à confusion et ne peut être confondu soit avec des artéfacts soit avec des colorations non spécifiques. Il est toutefois nécessaire d'examiner 700 à 800 cellules avant d'avancer un résultat négatif.

Nous allons maintenant étudier les résultats pratiques obtenus par Schneider.

1) PÉRIODE D'APPARITION ET DURÉE DE PRÉSENCE DU VIRUS DANS LA CORNÉE

A) PREMIERE EXPÉRIENCE

Deux groupes de souris sont infectés, l'un par voie intracérébrale, l'autre par voie plantaire, avec du virus non dilué.

Chaque jour on étudie le cas de deux souris, à savoir que l'on étudie la virulence du cerveau, de la moelle épinière, des glandes salivaires, de l'épithélium cornéen.

Le moment de l'apparition du virus dans la cornée varie avec la voie d'inoculation : il est de 4 à 5 jours après l'inoculation I.C. à 7 à 8 jours après l'inoculation périphérique.

La première conclusion est donc que la cornée ne contient pas de virus pendant la première moitié de la période d'incubation.

Les centres nerveux supérieurs contiennent des antigènes spécifiques couramment 2 à 3 jours plus tôt.

Les glandes salivaires n'ont jamais contenu dans cette expérience de virus avant l'infection de la cornée.

Toutefois l'apparition des témoins de l'infection a pu être quelquefois simultanée chez certains animaux, dans la cornée et dans les glandes salivaires.

B) DEUXIEME EXPÉRIENCE

4 groupes de 5 souris sont inoculés par voie cérébrale à l'aide de suspension de virus dont la dilution varie de 10^5 à 10^2. 10 autres souris sont inoculées par voie périphérique avec un virus non dilué.

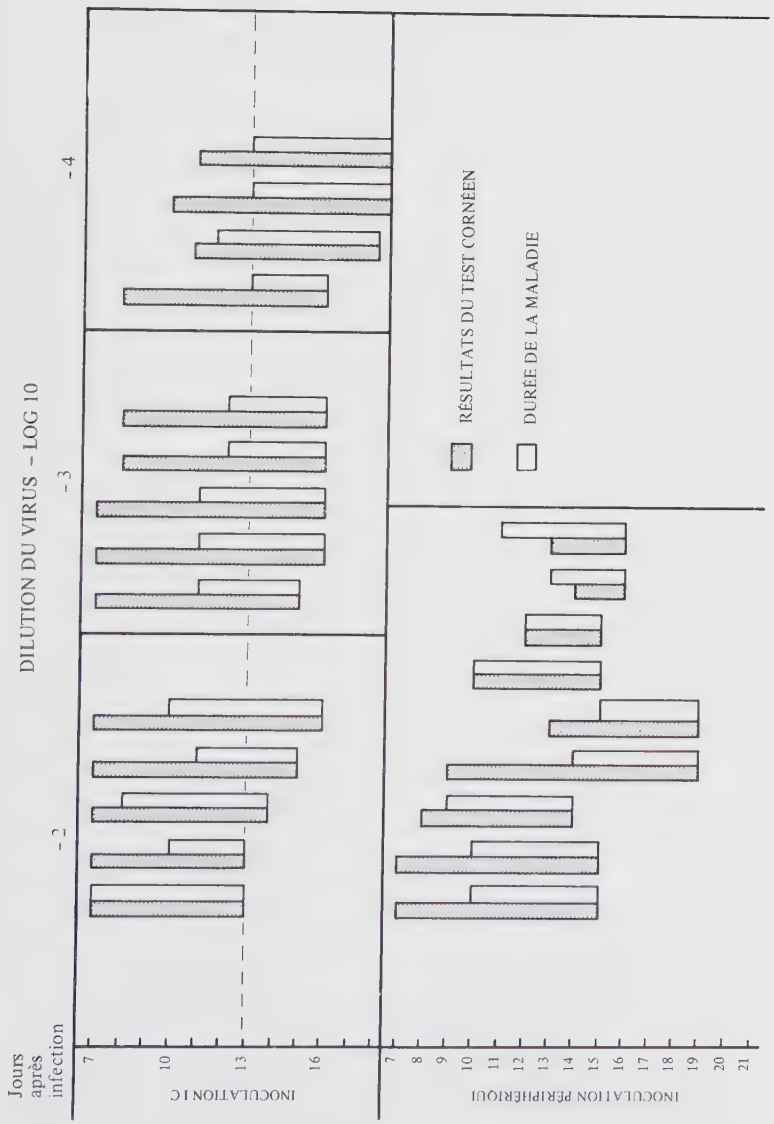
Sur chaque souris le frottis cornéen est mis en œuvre quotidiennement à partir du 7ème jour après l'infection jusqu'à la mort. Les doses employées par la voie I.C étant plus faible que précédemment il ne devrait pas y avoir apparition d'antigène cornéen avant ce stade.

Schneider a rassemblé les résultats de son expérience dans le tableau ci-après.

Un groupe de souris manque sur ce tableau. C'est celui qui a reçu la plus forte dilution de virus. Toutes ces souris ont survécu et aucune d'entre elles n'a présenté de cellules cornéennes positives.

RÉSULTATS

La première chose à noter est que dans tous les cas mortels, le frottis cornéen a été positif avant la mort.


DILUTION DU VIRUS – LOG 10
- 2
- 3
- 4
Jours après infection
INOCULATION I.C
INOCULATION PÉRIPHÉRIQUE
RÉSULTATS DU TEST CORNÉEN
DURÉE DE LA MALADIE

Sur le groupe de souris inoculées par voie intra-cérébrale, le frottis cornéen s'est révélé positif dans 13 cas sur 14 avant l'apparition des symptômes *(93%)*.

Sur 10 de ces 13 souris *(70%)* le frottis était positif de 3 à 4 jours avant les premiers symptômes.

Sur les 3 autres animaux, le frottis était positif 5,2 ou 1 jours avant les premiers symptômes.

Une seule souris présentait des symptômes le 7ème jour et à cette date son frottis était positif.

Si pour ce premier groupe de souris le frottis cornéen a permis un diagnostic précoce dans la plupart des cas avant l'apparition des symptômes, ce qui est très intéressant pour le dépistage de la maladie, il n'en est plus de même pour les animaux inoculés par voie périphérique.

Le frottis a été positif avant l'apparition de la maladie clinique pour 5 souris sur 9 *(55%)*.

Le résultat le plus précoce fut enregistré 5 jours avant la maladie.

Deux souris ont eu un frottis positif le jour de l'apparition des symptômes.

Deux souris ont eu un frottis positif après apparition des symptômes.

Une souris a survécu.

Il est intéressant de noter que dans les 23 cas étudiés, dès que le frottis est devenu positif il le reste jusqu'à la mort de l'animal.

2) RELATION ENTRE LE FROTTIS CORNÉEN ET L'APPARITION DE L'INFECTION DES GLANDES SALIVAIRES

Nous avons rapporté dans la première partie de ce travail que œil et glandes salivaires sont innervés par les nerfs trijumeau et facial.

Ces deux nerfs ont des noyaux très proches dans la substance cérébrale.

Ceci explique le fait noté dans la première expérience de Schneider que l'infection de la cornée et celle des glandes salivaires semblent débuter ensemble.

Une nouvelle expérience va lui permettre d'affirmer ce résultat sur la souris.

Nous verrons que, malheureusement, l'extrapolation est impossible et que la présence d'un frottis cornéen négatif ne permet pas d'écarter le diagnostic de rage, par exemple, chez un animal mordeur.

EXPÉRIMENTATION

On utilise un groupe de 20 souris inoculées par injection de suspension virulente dans la voute plantaire antérieure droite.

Le frottis cornéen est effectué quotidiennement sur chaque souris et ce :

- jusqu'à ce qu'il donne un résultat positif,
- ou bien que des symptômes cliniques se développent.

L'animal est alors sacrifié et l'on recherche si les glandes salivaires sont infectées ou non.

Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Nombre de souris	Résultats du frottis	nième jour après infection	État clinique	Inf. des glandes salivaires
12	+	7è au 9è	ϕ	+ 3/12
6	+	8è au 12è	+	+ 1/6
1	ϕ	10ème	+	ϕ
1	ϕ	30ème	à survécu	ϕ

On note que chez 12 souris sur 19, le frottis cornéen est devenu positif avant l'établissement des symptômes cliniques.

Pour 6 autres souris, le frottis cornéen révéla des antigènes rabiques le jour de l'apparition des premiers symptômes.

Une souris enfin, présentant des signes de maladie, mais à frottis cornéen négatif, fut tuée le 10ème jour après l'inoculation. Les glandes salivaires n'ont révélé la présence d'aucun antigène viral.

Une souris a survécu.

Le fait le plus important à noter dans cette expérience est la relation existant entre l'infection des glandes salivaires et l'infection de la cornée.

EXAMINONS LES RÉSULTATS

Le jour où le frottis cornéen devient positif, il est possible chez un petit nombre de souris *(4 sur 18)* de trouver du virus rabique dans les glandes salivaires.

Chez les autres, toutes les recherches en ce sens sont restées vaines. Il a fallu attendre que la maladie progresse pour que ces glandes s'infectent.

Sur ces 4 souris, 3 étaient apparemment en bonne santé ; une présentait les premiers symptômes de rage.

D'autre part, il est bon de noter que ces quatre souris présentaient un nombre important de cellules cornéennes infectées *(de 1% à 4%)*. Proportion normale chez les autres animaux : *(1/300 à 1/1000)*.

En comparant les résultats de cette expérience et de la première réalisée, on note que le virus apparaît toujours plus tard dans les glandes salivaires que dans la cornée. Au maximum peut-on remarquer une apparition simultanée dans ces deux organes.

Il semble d'ailleurs y avoir une relation entre le nombre de cellules cornéennes trouvées infectées et la probabilité de trouver du virus dans les glandes salivaires.

Plus ce nombre est grand, plus la probabilité l'est aussi. Schneider signale cependant l'impossibilité d'extrapoler ces résultats aux animaux mordeurs avant des études ultérieures.

Il semble en effet tentant au vu de ces résultats de changer complètement d'attitude vis-à-vis des animaux mordeurs, le chien en particulier.

Si l'infection salivaire suit toujours exactement l'infection cornéenne, le résultat du frottis cornéen pourrait décider seul le Médecin à entreprendre ou non le traitement de la personne mordue.

Nous sommes très méfiants vis-à-vis de cette hypothèse et quelques expériences futures nous apprendront à le rester.

Schneider eut également la possibilité d'expérimenter le frottis cornéen sur 4 renards infectés naturellement.

Sur 3 renards, l'immunofluorescence effectuée sur la substance cérébrale se révéla positive sans doute possible. Il en fut de même pour les frottis cornéens réalisés sur les deux yeux.

Sur un quatrième renard, les antigènes cérébraux furent très difficiles à révéler en raison de l'état de décomposition avancé du cerveau.

Par contre, le frottis cornéen aisément réalisé donna rapidement des résultats sans équivoque et fiables puisque spécifiques.

Si l'on regroupe les résultats de ces différentes expériences, on arrive aux conclusions suivantes :

- Le frottis cornéen rend le diagnostic de la rage possible avant l'apparition des symptômes.

- Dans *93%* des cas chez les souris inoculées par la voie intra-cérébrale, dans *55 à 63%* des cas, lors d'inoculation périphérique, on a pu révéler l'infection rabique jusqu'à 5 jours avant l'apparition des symptômes chez la souris.
- Dans *21%* des cas le frottis est devenu positif le jour de l'apparition des symptômes.

Au total il est donc possible de réaliser un diagnostic très précoce *(avant ou au moment de l'apparition des symptômes)* chez plus de *90%* des souris.

De plus, une fois que le virus est apparu dans la cornée, il y reste jusqu'à la mort de l'animal. Il apparaît d'ailleurs dans la cornée toujours avant la mort.

Le frottis cornéen semble donc être une excellente méthode de diagnostic de la rage sur l'animal vivant, avant ou pendant la maladie clinique.

TRAVAUX DE ZIMMERMANN

Reprenant les travaux de Schneider, Zimmermann a eu la possibilité d'appliquer le frottis cornéen à des animaux infectés naturellement.

Les recherches ont porté sur 8 animaux atteints cliniquement de rage : 6 bovins, 1 cheval et 1 chien.

Les frottis cornéens ont été effectués pour la plupart, par des praticiens vétérinaires avant ou juste après la mort des animaux, puis expédiés le plus rapidement possible aux centres de recherches.

Ces préparations ont été fixées à l'acétone puis colorées par la méthode directe d'immunofluorescence. 100 cellules

au moins, ont été examinées par animal, ce qui semble constituer un minimum valable.

De plus, Zimmermann a recherché l'infection des glandes salivaires par inoculation à la souris, de 0,03 à 0,05 ml d'une solution à 10% de glandes par voie intra-cérébrale.

L'observation de ces souris inoculées dure 30 jours ; elles sont ensuite sacririées ; leur substance cérébrale est alors traitée par immunofluorescence.

Les résultats du travail sont réunis dans ce tableau :

N° animal	Type	Résultat frottis	Recherche cerveau	Parotide	Sublinguale
1	Bovin	+	+	φ	φ
2	Équin	+	+	φ	φ
3	Bovin	+	+	φ	φ
4	Bovin	+	+	φ	φ
5	Bovin	–	+	φ	φ
6	Bovin	–	+	nég.	φ
7	Bovin	–	+	pos.	φ
8	Chien	–	+	pos.	nég.

Chez les quatre premiers animaux, frottis cornéen et immunofluorescence cérébrale, ont été positifs sans équivoque possible. Le frottis a été réalisé du vivant de l'animal.

Chez les animaux suivants, le frottis cornéen a toujours été négatif, que ce soit avant ou juste après la mort. Par contre les coupes cérébrales montraient des particules antigéniques en grand nombre.

Restait à vérifier chez ces animaux à frottis cornéen négatif, si l'on pouvait se fier à ce résultat pour affirmer ou infirmer l'infection des glandes salivaires.

Les recherches ont été menées sur trois animaux ; deux

vaches et un chien. Chez deux d'entre eux, il a été possible de trouver du virus rabique dansla glande parotide.

Pour la vache N° 7, 4 souris ont été inoculées à l'aide d'extraits de porotide à la dilution précédemment citée. Après 47 jours d'observation, aucune n'était malade. Après sacrifice et immunofluorescence de la substance cérébrale, une seule souris s'est révélée porteuse de virus et en très grand nombre, il est vrai.

Ces résultats prouvent que la parotide de la vache ne contenait que fort peu de virus rabique.

Le chien N° 8 est mort le 6ème jour de sa maladie clinique.

Des frottis ont été réalisés les 4ème et 6ème jours *(avant et 1 heure après la mort)*. Au cours de ces expériences 999 cellules ont été examinées. Elles étaient vierges de toute particule virale.

Des souris inoculées avec les glandes parotides de ce chien, sont toutes mortes de 7 à 13 jours après l'inoculation, preuve d'une infestation sévère de ces glandes. L'immunofluorescence de la substance cérébrale a prouvé que cette mort était bien due à la rage.

Les recherches sur la glande sublinguale sont restées négatives.

Dans ces expériences, le frottis cornéen n'a donc permis de diagnostiquer que la moitié des cas de rage **clinique**.

Il a été impuissant à révéler l'infection des glandes salivaires chez le chien bien que chez cet animal, 1000 cellules aient été observées.

Néanmoins le frottis peut se montrer très pratique pour le diagnostic de la rage chez les bovins qui présentent toujours des symptomes très frustes. Sa mise en œuvre est, en effet, aisée et il sera plus facile pour un éleveur d'admettre l'abattage

d'un animal enragé que celui d'une vache présentant quelques coliques.

De plus, ce frottis étant parfaitement spécifique, la positivité de ses résultats devra conduire sans délai à l'abattage de l'animal considéré.

La question se pose de savoir si ces résultats négatifs ne sont pas dus à une insuffisance de méthode et tout particulièrement à un nombre trop faible de cellules observées.

Si 100 à 200 cellules étudiées semblent constituer une bonne moyenne pour un diagnostic de routine, on note cependant que chez le chien bien que ce nombre ait été porté à 1000, il a été impossible de diagnostiquer la rage et encore moins bien sûr, de trouver un témoin de l'infection des glandes salivaires.

De toute façon, les différences de morphologie cranienne et donc de longueur des nerfs intéressés sont telles chez le chien, qu'il semble difficile de pouvoir un jour découvrir une relation exacte entre infection de la cornée et infection des glandes salivaires.

TRAVAUX DE MÉDECINE HUMAINE ET DIAGNOSTIC CHEZ L'HOMME

Après les vétérinaires, certains médecins se sont penchés sur le diagnostic par frottis cornéen de la rage chez l'homme.

Une première série de diagnostics a porté sur 5 malades hospitalisés dans divers hôpitaux de Mexico après morsures par chiens errants. Des frottis cornéens ont été réalisés chez ces 5 malades avant le décès survenu de 1 à 3 jours après l'hospitalisation. Le prélèvement a été effectué en appuyant 20 fois fortement la lame porte objet sur la cornée en tenant

les paupières bien écartées. Les lames sont séchées à l'air, fixées dans l'acétone 10 mn à température ambiante, puis subissent la coloration par immunofluorescence indirecte.

Chez ces 5 sujets, le frottis cornéen a permis un diagnostic précis de la rage amplement confirmé par les examens post mortem *(coloration de Sellers et immunofluorescence de la substance cérébrale. Inoculation à des souriceaux nouveau nés).*

Un autre diagnostic a pu être effectué en partie grâce à cette méthode, à la clinique de réanimation de l'hôpital Claude Bernard à Paris.

Il s'agit d'un cas de rage survenu sur un enfant noir, originaire d'Afrique équatoriale, âgé de 10 ans, qui a été mordu onze mois plus tôt par un chien.

L'enfant présente des signes cliniques à son arrivée à l'hôpital : cris, agitation désordonnée ou crises de somnolence. Il est hospitalisé le 31 mars 1973.

Des frottis cornéens sont réalisés les 4, 5, 6, 9, 12 et 15 avril. Les cinq premiers prélèvements sont négatifs. Par contre, celui effectué le 15 avril révèle la présence d'antigènes rabiques et permet à lui seul un diagnostic de certitude. Ce diagnostic a été confirmé par les méthodes classiques, à savoir : séroneutralisation antirabique, inoculation aux souriceaux de salive prélevée le 5 avril. Ceux-ci sont sacrifiés le 19 avril : L'immunofluorescence cérébrale est positive. L'examen d'une biopsie cérébrale avec lésions de nécrose ischémique et quelques inclusions type corps de Négri, prouve qu'un processus polioencéphalitique compatible avec le diagnostic de rage est en train de se développer.

C'est donc le frottis cornéen qui, le premier, a permis le 15 avril d'affirmer le diagnostic de rage.
Ont suivi : le 16 avril l'élèvation des titres de séroneutralisation du sérum de l'enfant et le 19 avril la confirmation de la

virulence de la salive prélevée le 5 avril, par immunofluorescence de la substance cérébrale des souriceaux inoculés avec la dite salive.

Cette salive était d'ailleurs virulente 10 jours avant que le frottis cornéen ne devienne positif. Donc, une fois de plus, il semble utopique de pouvoir trouver une quelconque relation entre virulence de la salive et virulence de la cornée.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

Nous allons maintenant présenter nos travaux personnels :

Nous avons effectué nos observations au Laboratoire de maladies contagieuses de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. Les animaux utilisés étaient des lapins et des souris inoculés par nous mêmes, selon le protocole suivant :

I – PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

I – MODE D'INOCULATION

I.1 – SOUCHE

Deux souches de virus seront utilisées au cours de nos expériences :

- une première souche dite souche C.V.S,
- une deuxième souche *«sauvage»* propre au Laboratoire de Toulouse et isolée lors d'un foyer de rage survenu dans le Lot et Garonne.

I.2 – VOIE D'INOCULATION

I.2.1 – SOURIS

Les souris sont toujours inoculées par voie intra-cranienne.

On utilise une seringue type insuline, munie d'une aiguille pour injection intradermique. La souris est anesthésiée dans un bocal, grâce à un coton imbibé d'éther. La tête de l'animal étant maintenue entre le pouce et l'index de la main gauche, on perce facilement la boîte cranienne au moyen de la seringue, en un point légèrement en dehors du plan sagittal et formant un triangle isocèle avec l'œil et la base de l'oreille du côté considéré. On injecte 0,03 ml du liquide.

I.2.2 – LAPINS

Les lapins sont inoculés soit par **voie intracranienne** soit par **voie intramusculaire.**

I.2.2.1 – Inoculation intracranienne

L'inoculation intracranienne du lapin nécessite une opération supplémentaire à savoir, la trépanation de la voute cranienne au moyen d'une tige métallique pointue et stérile, que l'on fera pénétrer en force au travers de l'os. On utilise une aiguille plus longue et plus solide que précédemment. La dose injectée est de 0,1 ml.

I.2.2.2 – Injections intra-musculaires

Elles sont effectuées dans la région du cou à des doses de 0,2 à 0,5 ml.

II – OBSERVATION DES SYMPTOMES

Les différentes observations effectuées le furent chez ces animaux dès l'apparition des symptômes propres à la rage. A savoir :

II.1 – CHEZ LA SOURIS

Poil hérissé, tremblements, une certaine raideur de la démarche au niveau des pattes postérieures, suivie par une paralysie et enfin une prostration terminale.

II.2 – CHEZ LE LAPIN

Mydriase, puis des troubles méningés cérébelleux, consistant en mâchonnements, mouvements de la tête, incoordination motrice commençant aux pattes postérieures et suivie de paralysie. L'animal meurt en général en décubitus latéral et l'œil situé en région inférieure, est souvent atteint de conjonctivite, ce qui gêne quelque peu le travail ultérieur.

III – RÉALISATION DU FROTTIS CORNÉEN

Les deux extrémités d'une lame porte objet sont appuyées successivement deux ou trois fois sur l'œil de l'animal. Il est aussi possible de frotter légèrement la surface de la cornée avec la lame de manière à provoquer la desquamation d'un nombre plus important de cellules.

Les lames ainsi obtenues sont tout d'abord séchées à l'air libre, puis fixées par immersion dans l'acétone à température ambiante pendant 10 mn. Elles sont ensuite séchées, puis placées en chambre humide. Survient ensuite la réalisation de la réaction d'immunofluorescence indirecte proprement dite.

L'opérateur utilise des suspensions aqueuses de cerveaux de souris normales et de cerveaux de souris rabiques, infectées par le virus C.V.S diluées au 1/5° et un conjugué fluorescent antirabique dilué au 1/32° *(1 goutte de conjugué fluorescent de l'Institut Pasteur dilué dans 31 gouttes de suspension de cerveau centrifigée)* – cerveau normal ou rabique.

Sur le frottis droit de la lame on place une goutte ou deux de confugué additionné de suspension de cerveau normal : réaction proprement dite.

Sur le frottis gauche, on place une goutte de confugué additionné de suspension de cerveau rabique, sur lequel aucune réaction ne doit apparaître et qui servira de témoin : réaction d'extinction spécifique de la fluorescence.

La lame ainsi colorée est mise à l'étuve à 37° pendant 30 mn. Elle est ensuite lavée dans trois bains de sérum physiologique tamponné successifs, puis rincée une dernière fois sous un jet dudit sérum.

La lame est alors séchée et est désormais propre à l'observation au microscope à immunofluorescence au grossissement *400.*

Toute la surface du frottis est **systématiquement** observée au moyen des deux vis de réglage du chariot de platine. Le nombre de cellules infectées étant très faible ; aucune d'entre elles ne doit échapper à l'investigation.

IV – RÉALISATION DE L'IMMUNOFLUORESCENCE SUR LA SUBSTANCE CÉRÉBRALE

IV.1 – PRÉPARATION DES DÉCALQUES

IV.1.1 – CHEZ LA SOURIS

La fixer solidement au moyen d'épingles sur le socle d'autopsie. La calotte cranienne est soulevée au moyen de pince et de ciseaux fins, après dégagement de la peau.

Le cerveau est extrait avec précaution et placé dans une boîte de Pétri stérile.

Les sections sont effectuées perpendiculairement au plan sagittal et passent par le chiasma optique. On peut effectuer deux sections parallèles, ce qui permet d'obtenir deux coupes différentes, la tranche centrale étant rarement utilisable. On obtient les décalques en appliquant la lame porte objet sur la tranche de section.

IV.1.2 – CHEZ LE LAPIN

Le lapin étant fixé à la table d'autopsie, dégager largement la peau du museau jusqu'à la région cervicale. La boîte cranienne peut être alors ouverte au moyen de forts ciseaux et de fortes pinces, en un volet qui peut être récliné vers l'avant. Il faut réaliser les incisions en partant des orbites qui constituent un point faible.

Le cerveau est alors extrait par section du bulbe et de la région antérieure, et placé dans une boîte de Pétri.

La section permettant de réaliser les décalques passe *(le*

cerveau étant posé à plat) par le chiasma optique et peut être dirigée de haut en bas et d'avant en arrière *(parallèlement au bord postérieur des hémisphères).*

La préparation des lames et leur coloration est exactement la même que celle utilisée pour le frottis cornéen.

II – OBSERVATIONS

OBSERVATION N° 1

Quatre souris sont inoculées par voie intra-cérébrale avec une souche C.V.S les 25 et 16 janvier 1973.

Le 28 janvier, les deux premières souris présentent les symptômes de la maladie. Nous réalisons deux frottis sur chacune d'elles, à savoir : un par œil. Aucune cellule cornéenne positive ne sera décelée sur les lames. Par contre, l'immunofluorescence de la substance cérébrale réalisée le jour même sera positive sans équivoque possible.

Le 29 janvier, soit 3 jours après l'inoculation, les deux autres souris sont malades. Nous réalisons cette fois-ci quatre frottis *(deux par œil).* Sur l'un d'entre eux, nous trouvons un groupe de trois cellules contenant des particules antigéniques caractéristiques, sous la forme de très fines granulations fluorescentes *(de 10 à 15)*, groupées en couronne autour du noyau. Cette image est particulièrement nette. Aucune image comparable n'a été perçue sur le frottis témoin traité en réaction d'extinction.

L'immunofluorescence des centres nerveux confirmera le diagnostic précoce porté du vivant de l'animal, grâce au frottis cornéen.

OBSERVATION N° 2

Le 30 janvier, nous inoculons deux lapins par voie intracérébrale.

Le 7 février apparaissent sur les deux animaux les premiers troubles parétiques. Nous réalisons une première série de frottis cornéens. Aucune cellule cornéenne munie d'antigène rabique ne sera mise en évidence sur ces lames.

Le 8 février, nous réalisons de nouveaux frottis et en plus, après dissection et isolement les deux nerfs optiques sont également soumis à la réaction d'immunofluorescence. Ceci dans le but de vérifier si ce gros tronc nerveux est plus précocément contaminé que la cornée et dans quelle mesure.

Aucun antigène rabique ne sera décelé aussi bien dans la cornée que dans le nerf optique.

En tout, nous avons observé chez ces lapins 11 frottis cornéens assez riches en cellules. Il est à noter que, souvent, chez le lapin dans cette expérience et dans les futures, nous sommes gênés par la conjonctivite consécutive très certainement au décubitus latéral.

La présence de nombreux débris cellulaires kératinisés ou non, rend l'observation plus difficile. Mais à aucun moment nous n'avons trouvé trace de cellules au moins suspectes.

Les décalques cérébraux sont riches en antigènes fluorescents. *(fluorescence dont la spécificité est attestée par la réaction d'extinction pratiquée sur un 2ème decalque voisin sur la même lame).*

OBSERVATION N° 3

Le 5 mars, 3 souris sont inoculées avec du virus *«sauvage»*. L'incubation est beaucoup plus longue et le 20 mars, les 3

animaux étant atteints de signes cliniques, on pratique sur eux plusieurs opérations.

1) deux frottis cornéens *(un par œil)*,

2) les yeux sont ensuite prélevés, broyés et inoculés à des souris témoins pour vérifier la virulence globale de ces organes. Le broyat est réalisé dans un mortier, à l'aide d'eau distillée et de sable stérile. Les yeux de chaque souris sont préparés séparément et la solution obtenue est inoculée à des souris témoins *(deux)* à la dose de 0,03 ml.

3) Les centres nerveux des 3 souris subissent le même jour la réaction d'immunofluorescence.

RÉSULTATS DE L'OBSERVATION N° 3

Première souris (A) : Sur un des frottis réalisés, on relève un élément suspect présentant le même aspect que précédemment décrit *(couronne de particules fluorescente autour du noyau)*.

La première des souris inoculée avec le broyat d'œil mourra accidentellement le 24 mars: Il n'y aura aucune trace de fluorescence sur les centres nerveux.

La deuxième souris inoculée avec le broyat sera paralysée le 28 et mourra le 29. La réaction d'immunofluorescence sur les centres nerveux sera positive, sans doute possible.

Deuxième souris (B) : A nouveau, on note la présence sur un des frottis cornéens d'un élément caractéristique comportant une douzaine de particules fluorescentes autour du noyau.

Les deux souris inoculées avec l'œil mourront l'une le 28 et l'autre le 29 avec une immunofluorescence nettement positive des centres nerveux.

Troisième souris (C) : Aucun élément suspect n'est décelé sur le frottis cornéen ; par contre les deux souris inoculées avec

les yeux, mourront respectivement les 29 et 30 mars, soit 9 et 10 jours après l'inoculation. L'immunofluorescence de la substance cérébrale est à nouveau positive et prouve donc la rage.

Cette expérience montre tout d'abord que l'œil est globalement virulent. Il sera toutefois nécessaire de préciser quelle portion anatomique supporte le virus, virus qui doit s'y trouver en grande quantité étant donné la courte période d'incubation relevée.

D'autre part, chez deux souris sur trois, il a été possible de porter un diagnostic durant la vie de l'animal en observant un nombre limité de préparations et il est possible que l'observation de quelques frottis supplémentaires ait pu conduire au diagnostic sur la troisième souris.

OBSERVATION N° 4

Nous allons étudier le cas de 4 lapins inoculés selon diverses voies et avec les deux souches de virus qui sont à notre disposition. Ceci dans deux buts :

1) Réaliser de nouveaux frottis cornéens.
2) Inoculer à des souris les différentes parties de l'œil qui nous intéressent, à savoir : cornée et rétine.
   Des expériences antérieures ayant prouvé que la substance vitrée était régulièrement stérile.

Le 12 mai 1973, les 4 lapins reçoivent du virus rabique selon le schéma suivant :

Lapin n° 257 : voie intra-cérébrale 0,1 ml suspension virus sauvage.
Lapin n° 258 : voie intra-musculaire 0,2 ml suspension virus sauvage.

Lapin n° 259 : voie I.M. 0,2 ml virus C.V.S.

Lapin n° 260 : voie I.C. 0,1 ml virus C.V.S.

□ □ □

Le lapin n° 259 meurt le 22 mai, soit 10 jours après l'inoculation *(I.M., C.V.S.).* Cette mort nous semble précoce surtout chez un lapin inoculé par voie périphérique . .

Et, en effet,

– les 4 frottis cornéens sont négatifs
– les décalques de centre nerveux également
– les 4 souris inoculées *(2 avec la cornée, 2 avec la rétine)* ont survécu sans trouble.

Ce lapin n'est donc pas mort de rage.

□ □ □

Le lapin n° 257 *(I.C sauvage)* meurt le 2 juin après 3 jours de paralysie.

Les décalques de centres nerveux sont très positifs à la réaction d'immunofluorescence ; par contre les 6 frottis cornéens réalisés juste avant et après la mort, sont vierges de tout antigène rabique.

Les deux souris inoculées avec le broyat de rétine *(réalisé au mortier avec du sable stérile et de l'eau distillée + addition d'antibiotiques)* mourront le 10 juin. L'immunofluorescence des centres nerveux sera positive.

Les deux souris inoculées avec le broyat de cornée réalisé dans les mêmes conditions, resteront en vie sans troubles apparents.

□ □ □

Les lapins n° 258 et 260 subiront exactement les mêmes opérations et donneront les mêmes résultats que le lapin n° 257.

Au vu de cette nouvelle expérience, il apparaît que la rétine innervée par le court et gros nerf optique, est très fortement virulente.

Quant à la cornée, il semble qu'elle ne contienne pas de virus, puisque et l'inoculation à la souris et l'immunofluorescence des cellules de desquamation sont restées négatives.

La fréquence de la présence du virus rabique dans la cornée semble moins forte chez le lapin que chez la souris, que ce soit durant la phase clinique ou juste après la mort. Il n'a jamais été possible chez cette espèce, de le mettre en évidence dans la cornée, par quelle que méthode que ce soit.

CONCLUSIONS

Le frottis cornéen représente, somme toute, une méthode utile de diagnostic de la rage car il est rapide et facile à mettre en œuvre, spécifique dans ses résultats, sûr.

Compte tenu des recherches déjà réalisées et de nos propres observations, en faible nombre il est vrai, nous estimons que l'I.F. cornéenne est une méthode :

1) **Rapide** : on peut obtenir le résultat de la lecture sur la lame moins de deux heures après le prélèvement sur l'animal de laboratoire.

2) **Facile à mettre en œuvre** et sans danger : l'opérateur passe peu de temps auprès de l'animal supposé infecté, le risque de contamination est donc faible. Tout vétérinaire praticien pourra réaliser ce test qui ne demande pas de longues opérations d'autopsie et envoyer en petit emballage les lames au laboratoire chargé de l'analyse. Cette méthode se révèlera utile surtout chez les bovins, l'approche des carnivores enragés étant, en général, assez difficile *(quoique l'usage du fusil à seringue anesthésique puisse être encore envisagé chez eux)*.

3) **Spécifique dans ses résultats.** L'aspect des cellules atteintes est, nous l'avons vu, très caractéristique et si leur nombre est petit, parfois même très petit, elles sont aisées à reconnaître sans doute possible.

4) Mais la plus grande originalité de ce frottis est bien sûr de pouvoir être pratiqué **sur l'animal vivant** et même quelquefois de pouvoir permettre l'établissement d'un diagnostic de certitude pendant la période d'incubation.

   Il ne se révèle toutefois vraiment efficace qu'après déclaration des symptômes.

Enfin et surtout, les conclusions qui se rattachent au procédé méritent d'être nuancées : Si l'on peut se fier à un résultat positif donné par cette méthode et affirmer que l'animal est bien infecté de rage, il ne faut en aucun cas tenir compte d'un résultat négatif *«un résultat négatif ne saurait être considéré comme probant»*.

En effet, répétons le, le nombre de cellules infectées est très faible et pour affirmer une conclusion négative *(exclusion de rage)* il faudrait examiner un grand nombre de cellules *(plusieurs milliers)* ce qui rendrait la méthode très longue à mettre en œuvre et fastidieuse, lui faisant perdre ainsi deux de ses qualités primordiales. Il semble aussi que tous les cas de rage ne s'accompagnent pas de virulence cornéenne.

Enfin, l'œil de l'animal suspect ne résisterait pas longtemps aux prélèvements.

– – – –

Cette étude semble montrer, de plus, que cette méthode est plus efficace chez certaines espèces animales que chez d'autres. Si chez la souris le diagnostic a pu être souvent porté, chez le lapin cela n'a pas été possible, entre nos mains, même juste avant la mort.

Quant à une éventuelle relation entre virulence de la salive et résultat du frottis, il faut désormais la considérer comme inexistante. Tout d'abord parce que, comme nous l'avons vu plus haut, on n'est jamais sûr qu'un frottis est négatif ; d'autre part parce que, même après observation d'un grand nombre de cellules toutes vierges chez un chien enragé, la salive était virulente et que dans un cas de rage humaine la salive l'était également 10 jours avant que la première trace de virus soit trouvée dans la cornée.

Le frottis cornéen doit donc entrer dans la pratique courante du diagnostic de la rage car il est possible à tout vétérinaire ou médecin de réaliser facilement les lames destinées à l'étude par immunofluorescence.

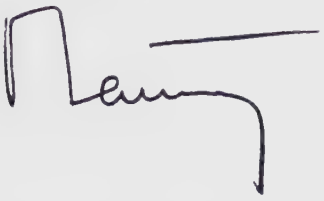
Il serait nécessaire d'étudier ce frottis chez les différentes espèces animales dans le but de savoir auxquelles il convient le mieux, c'est-à-dire chez quels animaux il permet de diagnostiquer la rage intra-vitam, dans le plus grand nombre de cas possible.

Par exemple, chez la souris, ce test semble sûr ; chez le lapin il ne l'est pas. Chez les bovins, il n'a permis dans l'expérience citée de ne diagnostiquer que la moitié des cas **cliniques.**

Pour finir, il semble que chez l'homme, le frottis soit une excellente méthode de diagnostic et plus précoce que toutes celles employées jusqu'à présent. Il représente un pas de plus dans la lutte contre cette terrible maladie qui continue à tuer régulièrement dès qu'elle s'est déclarée cliniquement et ce, bien que les méthodes les plus modernes de réanimation soient mises en œuvre.

– – – – – – – –

Vu : Le Professeur de l'École, Rapporteur,

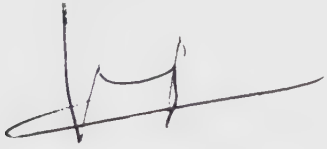


Professeur SAURAT

Vu : Le Directeur de l'École Vétérinaire,

Professeur R. LAUTIÉ.

Vu : Le Président de la Thèse,



Professeur ARMENGAUD

Vu et Permis d'imprimer :
Toulouse, le 3 Septembre 1974

Le Président de l'Université Paul-Sabatier,

Professeur LARENG.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDRAL (L.) –
Diagnostic clinique de la rage. *Informations techniques des D.S.V.*, 1969, *25-26*, p. 23-36.

2. ANDRAL (L.), TOMA (B.) –
Étude de l'épidémiologie de la rage vulpine en France (1968-1973) – *Cah. Méd. Vet.*, 1973, *42*, 203-214.

3. CARNERO (R.), LAHELLEC (A.), LUCAS (A) –
Diagnostic expérimental de la rage. *Informations techniques des D.S.V.*, 1969, *25-26*, p. 37-46.

4. CIFUENTES CORTES (M.H.) –
Le diagnostic de la rage par l'épreuve de la cornée en région endémique. *Annales des anciens élèves de l'Institut Pasteur*, p. 108-109.

5. DESLIENS (Michel) –
Contribution à la pratique du diagnostic de la rage canine. *Thèse Doct. Vét., Lyon* 17 Déc. 1969.

6. FISCHMAN –
Mise en évidence du virus rabique sur des coupes traitées à la paraffine par immunofluorescence. *Am. J. Vet. Res.*, 1969, *30*, (7).

7. GOLDWASSER (R.A.), KISSLING (R.E.), CARSKI (T.R.) et HOSLY (T.S.) - *Bull. Org. Mond. Santé*, 1959, *20*, 579.

8. GORET (P.), TOMA (B.) –
Les nouveaux visages de la rage. *Informations techniques des D.S.V.*, 1969, *25-26*, p. 7-22.

9. JOUBERT (L.) ET LOMBARD (M.) –
Pratique du diagnostic actuel de la rage. *Revue de Méd. Vét.*, 1968, *119, 11*, 1041.

10. LEPINE (P.) –
Méthode de diagnostic de la rage. *Rapports O.M.S., F.A.O*, 1954, *Partie V*, p. 257-285.

11. LEVADITI (C.) ET SCHOEN (R.) –
Les corps de NÊGRI dans le cytoplasme des épithéliums de la cornée. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1935, Suppl. commémorative, 55-69-96.

12. LEWIS (J.L.), Mc QUEEN (A.L.), SCHNEIDER (L.G.) –
Rabies diagnosis by fluorescent antibody. *Amer. J. Public. Hlth*, 1960, n° 5.

13. SCHAAL (E.) ET KLEIDAMPF (I.) –
Sur le problème de la mise en évidence des effets de la vaccination antirabique par la technique d'immunofluorescence. *Zentral blatt für Veterinär medizin*, 1967, *14*, p.507-515.

14. SCHNEIDER (Lothar G.) –
The cornea test, a nex method for the intravitam diagnosis of rabies – *Zbl. Vet. Med.*, 1969, *B-16*, p. 24-31.

15. TAGAND (R.), BARONE (R.) –
Anatomie des équidés domestiques. *Nevraxes et méninges*, 1962, 3 - 1.

16. VIC-DUPONT (F.), VACHON (C.), GILBERT (F.), TREMOLIERES (P.), LE BIGOT (A.) –
A propos d'un cas de rage humaine traité à la Clinique de Réanimation de l'Hopital Claude Bernard. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1973 - 3-11 - 405-409.

17. ZIMMERMAN (Th. von).
Test de la cornée chez les animaux domestiques suspects de rage, – *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 1972, *184*, n° 9, p. 172-174.